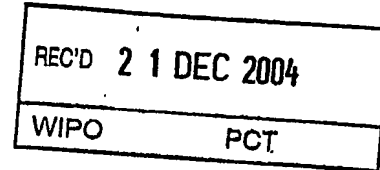


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

11 DEC 2004

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 54 351.1

Anmeldetag: 20. November 2003

Anmelder/Inhaber: november Aktiengesellschaft Gesellschaft für
Molekulare Medizin, 91056 Erlangen/DE

Bezeichnung: Verfahren und Vorrichtung zur verbesserten
Reinigung einer an paramagnetische Mikro-
partikel gebundenen Substanz

IPC: B.03 C, B 01 D

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 6. Dezember 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Agurks

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Verfahren und Vorrichtung zur verbesserten Reinigung einer an paramagnetische Mikropartikel gebundenen Substanz

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur verbesserten Reinigung einer an paramagnetische Mikropartikel gebundenen Substanz und eine zur Durchführung des Verfahrens geeignete Vorrichtung.

Magnetische Mikropartikel werden vor allem in diagnostischen und analytischen Verfahren eingesetzt. Sie weisen eine im Verhältnis zu ihrer Masse große Oberfläche auf, an der nachzuweisende Analyte über eine Beschichtung spezifisch gebunden werden können. Die Mikropartikel können mit Hilfe eines Magnetfelds reversibel immobilisiert werden. Nicht gebundene Stoffe können dann zusammen mit der diese Stoffe enthaltenden Flüssigkeit von den Mikropartikeln abgesondert werden. Die Mikropartikel können danach in einer Waschflüssigkeit gewaschen und spezifisch gebundene Stoffe mit einer Elutionsflüssigkeit eluiert werden. Ein beim Absondern auftretender Flüssigkeitsstrom kann bewirken, dass ein Teil der magnetisch immobilisierten Mikropartikel suspendiert und mitgeschwemmt wird. Das führt zu einem Verlust der gebundenen Analyte. Beim Eluieren mitgeschwemmten Mikropartikel können wegen ihres Eisengehalts eine nachfolgende Reaktion, wie z. B. eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR), stören. Weiterhin können durch die mitgeschwemmten Mikropartikel Detektionsverfahren gestört werden, die auf optischen Eigenschaften beruhen, weil die Mikropartikel Licht streuen und absorbieren können und weil sie eine Fluoreszenz aufweisen können. Darüber hinaus können elektrochemische Detektionsverfahren beeinflusst werden, z. B. weil das in den Mikropartikeln enthaltende Eisen dabei reduziert werden kann. Durch die mitgeschwemmten Mikropartikel kann die Empfindlichkeit des diagnostischen oder analytischen Verfahrens verringert werden.

Bei medizinischen Anwendungen des gereinigten Stoffs können mitgeschwemmte Mikropartikel immunogen wirken oder eine Thrombenbildung induzieren. Ein weiteres bei medizinischen Anwendungen auftretendes Problem besteht darin, dass die Mi-
5 kropartikel Filter zusetzen können, die beispielsweise zum Sterilfiltrieren von zu verabreichenden Lösungen eingesetzt werden. Nachteilig ist auch, dass die Mikropartikel den gereinigten Stoff wieder binden und dadurch die zur Verfügung stehende Menge dieses Stoffs verringern können.

Aus der US 4,910,148 ist eine Vorrichtung zum Absondern magnetisierter Partikel aus biologischen Flüssigkeiten, in denen die magnetisierten Partikel suspendiert sind, bekannt. Die Vorrichtung enthält eine magnetische Platte mit einer
15 Vielzahl von Permanentmagneten. Zum Absondern der magnetisierten Partikel wird die biologische Flüssigkeit mit den darin suspendierten magnetisierten Partikeln in einem Behälter über der Platte bewegt. Während die magnetisierten Partikel durch die magnetische Platte zurückgehalten werden, wird
20 die biologische Flüssigkeit abgesaugt.

Aus der EP 0 237 549 B1 ist ein Abscheidegerät zum Abtrennen magnetischer Partikel aus einem flüssigen Medium bekannt. Das Abscheidegerät enthält einen Abscheider mit einer Strömungskammer mit einem Eingang und einem Ausgang für das flüssige Medium sowie ein Magnetisierungsmittel. Je nach Stellung der Strömungskammer im Verhältnis zum Magnetisierungsmittel bildet sich in der Strömungskammer ein starkes oder ein schwaches Magnetfeld aus. Das Abscheidegerät kann aus einem ersten
25 und einem zweiten derart aufgebauten Abscheider bestehen. Dadurch kann ein Probendurchsatz erhöht werden. Weiterhin kann eine Fraktionierung einer Probe durch unterschiedlich eingestellte Abscheider erreicht werden.
30

Aus der US 2003/0095897 A1 ist ein Verfahren bekannt, bei dem eine Flüssigkeit mit darin dispergierten magnetischen Partikeln durch ein magnetisches Feld geleitet wird, wobei die magnetischen Partikel festgehalten werden. Das Magnetfeld ist konstant. Das Lösen der magnetisch festgehaltenen Partikel erfolgt durch einen gepulsten Flüssigkeitsstrom.

Bei allen bekannten Verfahren besteht ein Nachteil darin, dass die Strömung einer Flüssigkeit, die an den magnetisch bereits festgehaltenen Partikeln vorbei strömt, ein Suspensieren dieser Partikel bewirken kann. Dadurch können die bereits magnetisch festgehaltenen Partikel mit der Flüssigkeit mitgeschwemmt werden. Damit sind die oben genannten Nachteile verbunden.

15

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, insbesondere diese Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll ein Verfahren und eine Vorrichtung bereitgestellt werden, die es erlauben, paramagnetische Mikropartikel in einem fluidischen System möglichst quantitativ magnetisch festzuhalten und gegebenenfalls wieder freizusetzen. Das Verfahren und die Vorrichtung sollen einfach und preiswert realisierbar sein.

20

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 12 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 11 und 13 bis 30.

25

Erfindungsgemäß ist ein Verfahren zur verbesserten Reinigung einer ersten Substanz, welche an paramagnetische Mikropartikel gebunden ist, wobei die Mikropartikel in einer ersten Flüssigkeit suspendiert sind, mit folgenden Schritten vorgehen:

30

a) die Mikropartikel werden in einem ersten Behälter einem ersten Magnetfeld ausgesetzt, um sie dadurch festzuhalten und

35

daran zu hindern, mit einem Strom der ersten Flüssigkeit mitgeschwemmt zu werden und

b) zumindest ein Teil der ersten Flüssigkeit wird nach
5 Schritt lit. a in einer ersten Richtung durch eine erste Leitung durch einen Abschnitt der ersten Leitung hindurch geleitet und in dem Abschnitt mindestens einem zweiten oder erneut dem ersten Magnetfeld ausgesetzt, um dennoch mitgeschwemmte Mikropartikel dadurch festzuhalten, wobei in dem Abschnitt die Querschnittsfläche der ersten Leitung vergrößert ist,

wobei das zweite oder erste Magnetfeld innerhalb des Abschnitts eine größere durchschnittliche Feldstärke aufweist als das erste Magnetfeld innerhalb des ersten Behälters.

15 Bei der Substanz kann es sich um Zellen, Moleküle oder Aggregate handeln. Bei dem Teil der ersten Flüssigkeit gemäß Schritt lit. b handelt es sich bevorzugt um einen überwiegenden Teil der ersten Flüssigkeit oder um die gesamte erste
20 Flüssigkeit. Wenn die Mikropartikel beim Schritt lit. a dem ersten Magnetfeld ausgesetzt werden, wird dabei ein überwiegender Teil der in der ersten Flüssigkeit suspendierten Mikropartikel im ersten Magnetfeld zurückgehalten. Das Magnetfeld kann mittels eines Elektromagneten oder eines Permanentmagneten bereitgestellt werden. Das Festhalten gemäß Schritt
25 lit. a kann in einem Teil eines Behälters erfolgen, in welchem die Mikropartikel in der Flüssigkeit suspendiert sind. Der Magnet ist dabei bevorzugt so angeordnet, dass die magnetisch festgehaltenen Mikropartikel sich nicht an einer Position ablagern, in welcher sie den Fluss der Flüssigkeit durch
30 die erste Leitung behindern können. Der erste Behälter kann auch eine zum magnetischen Festhalten der Mikropartikel vorgesehene Kammer mit einer Zu- und einer Ableitung für die erste Flüssigkeit sein.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird beim Schritt lit. b durch die vergrößerte Querschnittfläche der ersten Leitung in dem Abschnitt die Strömungsgeschwindigkeit des Stroms der ersten Flüssigkeit reduziert. Dadurch wird das Festhalten der Mikropartikel im Abschnitt durch das erste oder zweite Magnetfeld erleichtert. Der Abschnitt der Leitung mit der vergrößerten Querschnittfläche kann in Form einer Kammer vorliegen. Das zweite oder erste Magnetfeld innerhalb des Abschnitts kann dadurch eine größere durchschnittliche Feldstärke aufweisen als das erste Magnetfeld innerhalb des ersten Behälters, dass der Abschnitt ein relativ geringes Volumen aufweist und sich dieses Volumen insgesamt dicht an einem das erste oder zweite Magnetfeld bewirkenden Magneten befindet. Somit kann die durchschnittliche Feldstärke im Abschnitt selbst dann größer sein als die durchschnittliche Feldstärke im ersten Behälter, wenn das zweite Magnetfeld insgesamt nicht stärker ist als das erste Magnetfeld oder das erste Magnetfeld sowohl im Behälter als auch im Abschnitt wirkt. Durch das Verfahren können aus dem ersten Behälter weggeschwemmte Mikropartikel im Abschnitt nahezu quantitativ festgehalten werden.

Die Reinigung gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren kann zur Probenaufbereitung für die Durchführung einer PCR oder ein Detektionsverfahren erfolgen. Sie kann auch dazu dienen, die erste Substanz für eine sonstige, beispielsweise medizinische, Anwendung zu reinigen. Bei den Anwendungen können die paramagnetischen Mikropartikel eine unerwünschte Verunreinigung darstellen.

Die im Abschnitt festgehaltenen Mikropartikel werden vorzugsweise zu den im Schritt lit. a festgehaltenen Mikropartikeln zurückgeführt. Dazu kann nach dem Schritt lit. b eine zweite und/oder dritte Flüssigkeit in einer zweiten Richtung in den Abschnitt und in einer der ersten Richtung entgegengesetzten

Richtung durch die erste Leitung geleitet werden, wobei ein Einwirken des ersten und des gegebenenfalls vorhandenen zweiten Magnetfelds auf die Mikropartikel aufgehoben wird, so dass die im Abschnitt festgehaltenen Mikropartikel suspendiert und zumindest teilweise zu den beim Schritt lit. a festgehaltenen Mikropartikeln zurückgeschwemmt werden. Dadurch kann der Verlust an paramagnetischen Mikropartikeln bei der Durchführung von Waschschritten deutlich verringert und die Ausbeute an der zu reinigenden ersten Substanz deutlich erhöht werden.

Die zweite Richtung, mit der die zweite und/oder dritte Flüssigkeit in den Abschnitt geleitet wird, kann beispielsweise senkrecht zur ersten Richtung sein, so dass die zweite und/oder dritte Flüssigkeit direkt auf die zurückgehaltenen Mikropartikel strömt und diese suspendiert. Das Abfließen der zweiten und/oder dritten Flüssigkeit durch die erste Leitung erfolgt in einer der ersten Richtung entgegengesetzten Richtung. Auch die zweite Richtung kann eine der ersten Richtung entgegengesetzte Richtung sein. Das vereinfacht den Aufbau der Vorrichtung, die ansonsten für das Einströmen der zweiten und/oder dritten Flüssigkeit in den Abschnitt beispielsweise eine weitere Leitung aufweisen müsste.

Die zweite Flüssigkeit ist im Allgemeinen eine Waschlösung. Diese kann eine identische Zusammensetzung aufweisen, wie die erste Flüssigkeit. Die zweite Flüssigkeit wird vorzugsweise so gewählt, dass die erste Substanz darin an die Mikropartikel gebunden bleibt und weitere Substanzen oder sonstige Verunreinigungen sich von den Mikropartikeln oder der ersten Substanz lösen. Das Lösen kann z. B. dadurch erreicht werden, dass die zweite Flüssigkeit ein Detergenz enthält. Die dritte Flüssigkeit kann so gewählt werden, dass sich die erste Substanz darin von den Mikropartikeln löst. Es handelt sich dabei im Allgemeinen um eine Elutionslösung.

Der Abschnitt ist vorzugsweise so geformt, dass beim Strömen der zweiten und/oder dritten Flüssigkeit in der zweiten Richtung im Abschnitt Verwirbelungen entstehen, so dass dort abgelagerte Mikropartikel suspendiert werden. Das kann z.B. durch einen entsprechend im Abschnitt angeordneten Vorsprung oder eine sonstige Einrichtung zum Leiten eines Flüssigkeitsstroms erfolgen. Besonders bevorzugt ist es, wenn eine zweite Leitung in dem Abschnitt eine Öffnung aufweist, über welche die zweite und/oder dritte Flüssigkeit so in den Abschnitt geleitet wird, dass im Abschnitt Verwirbelungen entstehen und dort abgelagerte Mikropartikel suspendiert werden.

Die Schritte lit. a und lit. b können mit der zweiten und/oder dritten Flüssigkeit anstatt der ersten Flüssigkeit wiederholt werden. Auch dabei werden die Mikropartikel weitgehend aus der zweiten und/oder dritten Flüssigkeit entfernt. Ist die dritte Flüssigkeit eine Elutionsflüssigkeit, kann diese nach Schritt lit. b direkt für ein Nachweisverfahren, wie eine PCR, eingesetzt werden. Das Nachweisverfahren wird durch die Mikropartikel nicht oder kaum beeinträchtigt, da diese, zumindest nahezu, quantitativ zurückgehalten werden. Ein Entfernen noch in der dritten Flüssigkeit enthaltener Mikropartikel, beispielsweise mittels eines Filters, ist nicht erforderlich. Das vereinfacht die Automatisierung des Verfahrens, da beim Filtrieren stets die Gefahr des Zusetzens des Filters bestehen würde und der zugesetzte Filter dann üblicherweise manuell ausgetauscht werden müsste.

Das erste Magnetfeld kann in einem Bereich innerhalb des ersten Behälters wirken. Die Mikropartikel können dem ersten und/oder zweiten Magnetfeld ausgesetzt werden, indem ein Permanentmagnet oder zwei Permanentmagnete an den Bereich und den Abschnitt heran geführt werden. Mit einem einzigen Magneten kann ein Magnetfeld erzeugt werden, bei welchem bei-

spielsweise im Bereich vor allem der eine Pol des Magneten und im Abschnitt vor allem der andere Pol des Magneten ein starkes Magnetfeld verursacht.

- 5 Die Mikropartikel weisen bevorzugt einen mittleren Durchmesser von 50 nm bis 50 μm , vorzugsweise von 500 nm bis 50 μm , auf. Solche Mikropartikel haben sich als besonders günstig für die Reinigung von Substanzen erwiesen. Die Mikropartikel können eine Beschichtung aus Glas, Silikat, Silan, einem Ionenaustauscher, einem Rezeptor, einem Liganden, einem Antigen, einem Antikörper oder einer Nukleinsäure aufweisen.

15 Weiterhin betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens. Die Vorrichtung enthält:

- einen ersten Behälter zur Bereitstellung oder Aufnahme einer ersten Flüssigkeit und von paramagnetischen Mikropartikeln,
- 20 - eine in den ersten Behälter mündende erste Leitung und
- einen Abschnitt der ersten Leitung, welcher gegenüber der sonstigen Querschnittfläche der ersten Leitung eine vergrößerte Querschnittfläche aufweist,
- 25 - einen ersten Magneten oder eine erste Aussparung zur Aufnahme eines ersten Magneten zur Erzeugung eines ersten Magnetfelds in einem Bereich des ersten Behälters und im Abschnitt oder
- 30 - einen ersten Magneten oder eine erste Aussparung zur Aufnahme eines ersten Magneten zur Erzeugung eines ersten Magnetfelds in einem Bereich des ersten Behälters und einen
- 35 zweiten Magneten oder eine zweite Aussparung zur Aufnahme ei-

nes zweiten Magneten zur Erzeugung eines zweiten Magnetfelds im Abschnitt,

5 - wobei der Bereich, der Abschnitt und die erste Aussparung oder der erste Magnet und sofern vorhanden die zweite Aussparung oder der zweite Magnet so angeordnet und/oder geformt sind, dass das vom ersten oder zweiten Magneten erzeugte oder erzeugbare erste oder zweite Magnetfeld innerhalb des Abschnitts eine größere durchschnittliche Feldstärke aufweist als das vom ersten Magneten erzeugte oder erzeugbare erste Magnetfeld innerhalb des ersten Behälters, auch wenn das zweite Magnetfeld insgesamt nicht stärker ist als das erste Magnetfeld.

15 Der Bereich des ersten Behälters ist ein Gebiet innerhalb des ersten Behälters und bevorzugt in der Nähe der Mündung der ersten Leitung im ersten Behälter. Der Bereich ist vorzugsweise so angeordnet, dass darin magnetisch festgehaltene paramagnetische Mikropartikel einen Flüssigkeitsfluss durch die
20 erste Leitung nicht behindern.

Der Magnet kann fest mit der Vorrichtung verbunden und beispielsweise als bei Bedarf aktivierbarer Elektromagnet ausgebildet sein.

25 Besonders bevorzugt sind der Bereich, der Abschnitt und die erste Aussparung oder der erste Magnet so angeordnet, dass ein vom ersten Magneten erzeugtes oder erzeugbares Magnetfeld sowohl im Bereich als auch im Abschnitt wirken kann oder
30 wirkt. Das kann beispielsweise dadurch gewährleistet werden, dass der Bereich und der Abschnitt sich auf gegenüberliegenden Seiten der ersten Aussparung befinden, in die der Magnet eingeführt werden kann, so dass ein Pol des Magneten auf den Bereich und der andere Pol des Magneten auf den Abschnitt
35 wirken kann.

Bevorzugt ist der Magnet ein Permanentmagnet. Zur Einwirkung auf die Mikropartikel kann er an den Abschnitt oder den Bereich herangeführt werden. Das ist bei einer automatisierten
5 Probenaufbereitung einfach zu gewährleisten. Die Vorrichtung selbst muss dann keinen Magneten aufweisen.

Der Abschnitt kann als eine Aussparung in der ersten Leitung ausgebildet sein. Die Aussparung kann dabei breit und flach ausgebildet sein. Dadurch kann eine hohe magnetische Feld-
10 stärke im Bereich der Aussparung bereitgestellt werden. Weiterhin kann dadurch die Strömungsgeschwindigkeit verlangsamt werden. Die Aussparung ist vorzugsweise so bemessen, dass sich die Mikropartikel darin ablagern können, ohne dadurch
15 die Querschnittfläche der ersten Leitung im Bereich der Aussparung gegenüber der sonstigen Querschnittfläche der ersten Leitung zu verkleinern. Ein solches Verkleinern der Querschnittfläche würde eine Verengung in der ersten Leitung und dadurch eine Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit bewirken.
20 Das könnte dazu führen, dass abgelagerte Mikropartikel mitgeschwemmt werden.

Der Abschnitt ist vorzugsweise so geformt, dass beim Strömen einer Flüssigkeit in eine erste Richtung im Abschnitt eine
25 laminare Strömung und beim Strömen der Flüssigkeit in eine zweite, insbesondere der ersten Richtung entgegengesetzte, Richtung eine verwirbelte Strömung entstehen kann. Dadurch können die im Abschnitt abgelagerten Mikropartikel besonders effizient suspendiert und zu den im Bereich abgelagerten Mi-
30 kropartikeln zurückgeführt werden.

Vorzugsweise zweigt von der ersten Leitung mindestens eine zweite Leitung ab. Beispielsweise kann sich die erste Leitung dazu in zwei Leitungen aufgabeln. Die Abzweigung bzw. Gabe-
35 lung kann sich im Abschnitt oder in Strömungsrichtung einer

vom ersten Behälter durch die erste Leitung strömenden Flüssigkeit nach dem Abschnitt befinden. Eine Öffnung der zweiten Leitung kann im Abschnitt münden, wobei die Öffnung so angeordnet ist, dass durch die Öffnung in den Abschnitt strömende Flüssigkeit im Abschnitt Verwirbelungen verursachen kann und dadurch dort abgelagerte Mikropartikel suspendiert werden können.

Als besonders günstig hat es sich erwiesen, wenn die erste Leitung einen Durchmesser von 50 μm bis 2 mm, bevorzugt von 100 μm bis 500 μm , aufweist. Vorteilhafterweise weist der Abschnitt eine Querschnittsfläche auf, die höchstens dreimal, vorzugsweise höchstens zweimal, so groß ist, wie die Querschnittsfläche der ersten Leitung. Das ermöglicht eine ausreichende Verringerung der Strömungsgeschwindigkeit, um eine Ablagerung der Mikropartikel im ersten oder zweiten Magnetfeld zu ermöglichen. Vorzugsweise weist der Abschnitt eine Querschnittsfläche von höchstens 2 mm², vorzugsweise 1 mm², auf.

In der erfindungsgemäßen Vorrichtung kann ein zweiter Behälter zur Bereitstellung einer zweiten Flüssigkeit, ein dritter Behälter zur Bereitstellung einer dritten Flüssigkeit und/oder ein vierter Behälter zur Aufnahme der ersten und ggf. zweiten und/oder dritten Flüssigkeit vorgesehen sein. Dadurch ist es möglich, die Vorrichtung als geschlossenes System bereitzustellen und die erste, zweite und/oder dritte Flüssigkeit nur innerhalb der Vorrichtung zu bewegen, ohne dass in der Vorrichtung enthaltene Flüssigkeit nach außen dringen kann. Das ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn mittels der Vorrichtung ein infektiöses oder sonst zumindest-potenziell gefährliches Material, wie beispielsweise Blut, zur Reinigung der Substanzen bearbeitet werden soll. Die zweite Leitung kann in den zweiten Behälter münden. Gegebenenfalls vorhandene weitere Leitungen können in den dritten oder vierten Behälter münden.

Im ersten, zweiten, dritten und/oder vierten Behälter kann jeweils ein darin verschiebbarer Kolben vorgesehen sein, mittels dem die erste, zweite oder dritte Flüssigkeit bewegt werden kann. Auch diese Maßnahme ermöglicht es, die Vorrichtung als geschlossenes System bereitzustellen. Zum Bewegen der Flüssigkeiten in der Vorrichtung ist es dann von außen nur erforderlich, die Kolben zu bewegen. Der erste, zweite, dritte und/oder vierte Behälter kann jeweils in Form einer austauschbaren, insbesondere flüssigkeitsgefüllten, Patrone vorgesehen sein. Dadurch können auf einfache Weise verschiedene erste, zweite oder dritte Flüssigkeiten zum Einsatz in der Vorrichtung bereitgestellt werden. Darüber hinaus kann durch den Einsatz von Patronen vermieden werden, dass die Flüssigkeiten offen gehandhabt werden müssen. Auch diese Maßnahme ist daher im Hinblick auf die Bereitstellung einer als geschlossenes System ausgebildeten Vorrichtung vorteilhaft. Statt des ersten, zweiten, dritten oder vierten Behälters kann die Vorrichtung jeweils eine Ausnehmung zur Aufnahme der Patrone aufweisen.

Bevorzugt ist der erste, zweite, dritte und/oder vierte Behälter zylinderförmig ausgebildet. Das hat sowohl im Hinblick auf den Einsatz von Patronen, als auch im Hinblick auf das Bewegen der Flüssigkeit mittels Kolben den Vorteil, dass auf Grund der Rotationssymmetrie ein fehlerhaft orientiertes Einsetzen der Patrone oder des Kolbens weit gehend ausgeschlossen werden kann. Der erste, zweite, dritte oder vierte Behälter weist vorzugsweise ein maximales Volumen von 50 μ l bis 50 ml, bevorzugt von 500 μ l bis 5 ml, auf. Enthält der Behälter einen Kolben, bezieht sich das maximale Volumen auf das Volumen bei ausgefahrenem Kolben.

Bevorzugt ist die Vorrichtung in ein Gerät zur, insbesondere automatisierten, Probenprozessierung einsetzbar. Das Gerät

und die Vorrichtung sind dabei aufeinander abgestimmt. Das Gerät kann beispielsweise mindestens eine Einrichtung zur Verschiebung des Kolbens bzw. der Kolben in der Vorrichtung aufweisen. Die Vorrichtung kann auch so ausgebildet sein, dass sie flüssigkeitsleitend mit dem Gerät verbunden werden kann. Dadurch kann eine Probe, welche eine zu-reinigende Substanz enthält, der Vorrichtung automatisiert von dem Gerät zugeführt werden. Weiterhin kann die gereinigte Substanz in dem Gerät weiterverarbeitet werden.

Besonders preiswert kann die Vorrichtung aus einem Kunststoff, insbesondere Polycarbonat, vorzugsweise mittels eines Spritzguss-Verfahrens, hergestellt werden.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung bei einem ersten Arbeitsschritt,

Fig. 2 eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung am Ende eines den Schritten lit. a und b des erfindungsgemäßen Verfahrens entsprechenden zweiten Arbeitsschritts,

Fig. 3 eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung am Ende eines im Anspruch 2 spezifizierten dritten Arbeitsschritts des erfindungsgemäßen Verfahrens,

Fig. 4 eine Draufsicht auf eine schematische Darstellung eines Abschnitts der ersten Leitung, welcher eine vergrößerte Querschnittfläche aufweist,

Fig. 5 einen Querschnitt durch diesen Abschnitt der ersten Leitung mit einem Magneten und in dem Abschnitt durch das Magnetfeld des Magneten festgehaltenen paramagnetischen Mikropartikeln und

5

Fig. 6 eine schematische Darstellung einer weiteren Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung zum Einsatz von ersten und zweiten Behältern in Form von Patronen.

Fig. 1 zeigt eine erfindungsgemäße in einem Substrat 42 gebildete Vorrichtung mit einem ersten Behälter 10, einem zweiten Behälter 12, einer ersten Leitung 14 und einem Abschnitt 16 mit einer gegenüber der ersten Leitung 14 vergrößerten Querschnittfläche. Im ersten Behälter 10 befinden sich paramagnetische Mikropartikel 18, welche in einer ersten Flüssigkeit 20 suspendiert sind. Im ersten 10 und zweiten Behälter 12 befindet sich jeweils ein verschiebbarer Kolben 22, 24. In einer zur ersten Leitung 14 hinführenden Zuleitung 26 befindet sich ein hier in Durchgangsstellung befindliches erstes Ventil 28. In einer vom Abschnitt 16 wegführenden weiteren Leitung 30 befindet sich ein hier in geschlossener Stellung befindliches zweites Ventil 32. Zwischen dem Abschnitt 16 und dem zweiten Behälter 12 befindet sich eine zweite Leitung 34. Zwischen dem Abschnitt 16 und dem ersten Behälter 10 befindet sich eine erste Aussparung 36. Zur Durchführung des Verfahrens wird zunächst der erste Kolben 22 angehoben. Dabei wird Flüssigkeit aus der Zuleitung 26 in den ersten Behälter 10 gesaugt und suspendiert dabei die darin befindlichen magnetischen Mikropartikel 18.

Bei dem in Fig. 2 dargestellten zweiten Arbeitsschritt wird zunächst ein Magnet 38 in die Aussparung 36 eingeführt. Das erste Ventil 28 wird geschlossen und das zweite Ventil 32 geöffnet. Anschließend wird der Kolben 22 nach unten bewegt und

dadurch die erste Flüssigkeit 20 durch die erste Leitung 14, den Abschnitt 16 und die weitere Leitung 30 durch das geöffnete zweite Ventil 32 aus dem ersten Behälter 10 herausgedrückt. Dabei werden die magnetischen Mikropartikel 18 in einem Bereich des Behälters und im Abschnitt 16 durch ein vom Magneten 38 erzeugtes erstes Magnetfeld festgehalten. Das erste Magnetfeld weist dabei innerhalb des Abschnitts 16 eine größere durchschnittliche Feldstärke auf als innerhalb des ersten Behälters 10. Das liegt daran, dass der Abschnitt 16 ein kleineres insgesamt näher am Magneten 38 angeordnetes Volumen aufweist, als der Behälter 10. Dadurch ist der durchschnittliche Abstand, den ein Mikropartikel zum Magneten im Abschnitt 16 aufweisen kann, geringer als der durchschnittliche Abstand, den ein Mikropartikel im Behälter 10 aufweisen kann.

Bei einem dritten in Fig. 3 dargestellten Arbeitsschritt ist der Magnet 38 aus der Aussparung 36 herausgenommen, so dass die paramagnetischen Mikropartikel 18 nicht mehr festgehalten werden. Das zweite Ventil 32 wird geschlossen. Die im zweiten Behälter 12 befindliche zweite Flüssigkeit 40 wird durch Herunterdrücken des Kolbens 24 durch die zweite Leitung 34, den Abschnitt 16 und die erste Leitung 14 in den ersten Behälter 10 gedrückt. Dabei wird der Kolben 22 angehoben. Die paramagnetischen Mikropartikel 18 werden dabei suspendiert. Die im Abschnitt 16 festgehaltenen paramagnetischen Mikropartikel 18 werden dabei in den Behälter 10 zurückgeschwemmt.

Fig. 4 zeigt eine Draufsicht auf den Abschnitt 16 der ersten Leitung 14, welcher gegenüber der ersten Leitung 14 eine vergrößerte Querschnittfläche aufweist.

Fig. 5 zeigt diesen Abschnitt 16 im Querschnitt. Im Abschnitt 16 befinden sich vom Magnetfeld des Magneten 38 festgehaltene paramagnetische Mikropartikel 18.

Fig. 6 zeigt eine schematische Darstellung einer weiteren Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Diese besteht aus einem Substrat 42, in welchem eine erste Aussparung 36 zur Aufnahme eines Magneten sowie eine dritte 44 und eine vierte Aussparung 46 zur Aufnahme jeweils einer den ersten 10 und zweiten Behälter 12 bildenden ersten und zweiten Patrone vorgesehen sind. Die Patronen können jeweils einen Kolben enthalten. Weiterhin weist die Vorrichtung ein erstes Ventil 28 und ein zweites Ventil 32, eine erste Leitung 14, einen Abschnitt 16, eine zweite Leitung 34 und eine weitere Leitung 30 auf. Das Substrat 42 kann aus einem, insbesondere mittels eines Spritzguss-Verfahrens verarbeiteten, Kunststoff bestehen.

Bezugszeichenliste

	10	erster Behälter
	12	zweiter Behälter
5	14	erste Leitung
	16	Abschnitt
	18	paramagnetische Mikropartikel
	20	erste Flüssigkeit
	22, 24	Kolben
10	26	Zuleitung
	28	erstes Ventil
	30	weitere Leitung
	32	zweites Ventil
	34	zweite Leitung
15	36	erste Aussparung
	38	Magnet
	40	zweite Flüssigkeit
	42	Substrat
	44	dritte Aussparung
20	46	vierte Aussparung

Patentansprüche

1. Verfahren zur verbesserten Reinigung einer ersten Substanz, welche an paramagnetische Mikropartikel (18) gebunden ist, wobei die Mikropartikel (18) in einer ersten Flüssigkeit (20) suspendiert sind, mit folgenden Schritten:

a) die Mikropartikel (18) werden in einem ersten Behälter (10) einem ersten Magnetfeld ausgesetzt, um sie dadurch festzuhalten und daran zu hindern, mit einem Strom der ersten Flüssigkeit (20) mitgeschwemmt zu werden und

b) zumindest ein Teil der ersten Flüssigkeit (20) wird nach Schritt lit. a in einer ersten Richtung durch eine erste Leitung (14) durch einen Abschnitt (16) der ersten Leitung (14) hindurch geleitet und in dem Abschnitt (16) mindestens einem zweiten oder dem ersten Magnetfeld ausgesetzt, um dennoch mitgeschwemmte Mikropartikel (18) dadurch festzuhalten, wobei in dem Abschnitt (16) die Querschnittsfläche der ersten Leitung (14) vergrößert ist,

wobei das zweite oder erste Magnetfeld innerhalb des Abschnitts (16) eine größere durchschnittliche Feldstärke aufweist als das erste Magnetfeld innerhalb des ersten Behälters (10).

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei nach dem Schritt lit. b eine zweite (40) und/oder dritte Flüssigkeit in einer zweiten Richtung in den Abschnitt (16) und in einer der ersten Richtung entgegengesetzten Richtung durch die erste Leitung (14) geleitet wird, wobei ein Einwirken des ersten und des gegebenenfalls vorhandenen zweiten Magnetfelds auf die Mikropartikel (18) aufgehoben wird, so dass die im Abschnitt (16) festgehaltenen Mikropartikel (18) suspendiert und zumindest teil-

weise zu den beim Schritt lit. a festgehaltenen Mikropartikeln (18) zurückgeschwemmt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die zweite Richtung der
5 ersten Richtung entgegengesetzt ist.

4. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die
zweite Flüssigkeit (40) so gewählt wird, dass die erste Sub-
stanz darin an die Mikropartikel (18) gebunden bleibt und
10 weitere Substanzen oder sonstige Verunreinigungen sich von
den Mikropartikeln (18) oder der ersten Substanz lösen.

5. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die
dritte Flüssigkeit so gewählt wird, dass sich die erste Sub-
15 stanz darin von den Mikropartikeln (18) löst.

6. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei der
Abschnitt (16) so geformt ist, dass beim Strömen der zweiten
(40) und/oder dritten Flüssigkeit in der zweiten Richtung im
20 Abschnitt Verwirbelungen entstehen, so dass dort abgelagerte
Mikropartikel (18) suspendiert werden.

7. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei ei-
ne zweite Leitung (34) in dem Abschnitt (16) eine Öffnung
25 aufweist, über welche die zweite (40) und/oder dritte Flüs-
sigkeit so in den Abschnitt (16) geleitet wird, dass im Ab-
schnitt (16) Verwirbelungen entstehen und dort abgelagerte
Mikropartikel (18) suspendiert werden.

30 8. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die
Schritte lit. a und b mit der zweiten (40) und/oder dritten
Flüssigkeit anstatt der ersten Flüssigkeit (20) wiederholt
werden.

9. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das erste Magnetfeld in einem Bereich innerhalb des ersten Behälters (10) wirkt und die Mikropartikel (18) dem ersten und/oder zweiten Magnetfeld ausgesetzt werden, indem ein Permanentmagnet (38) oder zwei Permanentmagnete (38) an den Bereich und den Abschnitt (16) heran geführt werden.

10. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Mikropartikel (18) einen mittleren Durchmesser von 50 nm bis 50 µm, vorzugsweise von 500 nm bis 50 µm, aufweisen.

11. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Mikropartikel (18) eine Beschichtung aus Glas, Silikat, Silan, einem Ionenaustauscher, einem Rezeptor, einem Liganden, einem Antigen, einem Antikörper oder einer Nukleinsäure aufweisen.

12. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11, enthaltend:

20

- einen ersten Behälter (10) zur Bereitstellung oder Aufnahme einer ersten Flüssigkeit (20) und von paramagnetischen Mikropartikeln (18),

25

- eine in den ersten Behälter (10) mündende erste Leitung (14) und

30

- einen Abschnitt (16) der ersten Leitung (14), welcher gegenüber der sonstigen Querschnittsfläche der ersten Leitung (14) eine vergrößerte Querschnittsfläche aufweist,

35

- einen ersten Magneten (38) oder eine erste Aussparung (36) zur Aufnahme eines ersten Magneten (38) zur Erzeugung eines ersten Magnetfelds in einem Bereich des ersten Behälters (10) und im Abschnitt (16) oder

- einen ersten Magneten (38) oder eine erste Aussparung (36) zur Aufnahme eines ersten Magneten (38) zur Erzeugung eines ersten Magnetfelds in einem Bereich des ersten Behälters (10) und einen zweiten Magneten oder eine zweite Aussparung zur Aufnahme eines zweiten Magneten zur Erzeugung eines zweiten Magnetfelds im Abschnitt (16),

10 - wobei der Bereich, der Abschnitt (16) und die erste Aussparung (36) oder der erste Magnet (38) und sofern vorhanden die zweite Aussparung oder der zweite Magnet so angeordnet und/oder geformt sind, dass das vom ersten oder zweiten Magneten erzeugte oder erzeugbare erste oder zweite Magnetfeld innerhalb des Abschnitts (16) eine größere durchschnittliche
15 Feldstärke aufweist als das vom ersten Magneten erzeugte oder erzeugbare erste Magnetfeld innerhalb des ersten Behälters (10).

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, wobei ein vom ersten Magneten (38) erzeugtes oder erzeugbares Magnetfeld sowohl im Bereich als auch im Abschnitt (16) wirken kann oder wirkt.

14. Vorrichtung nach Anspruch 12 oder 13, wobei der Magnet (38) ein Permanentmagnet ist.

25

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei der Abschnitt (16) als eine Aussparung in der ersten Leitung (14) ausgebildet ist.

30 16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei der Abschnitt (16) so geformt ist, dass beim Strömen einer Flüssigkeit in eine erste Richtung im Abschnitt (16) eine laminare Strömung und beim Strömen der Flüssigkeit in eine zweite, insbesondere der ersten Richtung entgegengesetzte, Richtung
35 eine verwirbelte Strömung entstehen kann.

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 16, wobei von der ersten Leitung (14) mindestens eine zweite Leitungen (34) abzweigt.

5

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 17, wobei eine Öffnung der zweiten Leitung (34) im Abschnitt (16) mündet, wobei die Öffnung so angeordnet ist, dass durch die Öffnung in den Abschnitt (16) strömende Flüssigkeit im Abschnitt (16) Verwirbelungen verursachen kann und dadurch dort abgelagerte Mikropartikel (18) suspendiert werden können.

10

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 18, wobei die erste Leitung (14) einen Durchmesser von 50 μm bis 2 mm, bevorzugt von 100 μm bis 500 μm , aufweist.

15

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 19, wobei der Abschnitt (16) eine Querschnittfläche aufweist, die höchstens dreimal, vorzugsweise höchstens zweimal, so groß ist wie die Querschnittfläche der ersten Leitung (14).

20

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 20, wobei der Abschnitt (16) eine Querschnittfläche von höchstens 2 mm², vorzugsweise höchstens 1 mm², aufweist.

25

22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 21, wobei darin ein zweiter Behälter (12) zur Bereitstellung einer zweiten Flüssigkeit (40), ein dritter Behälter zur Bereitstellung einer dritten Flüssigkeit und/oder ein vierter Behälter zur Aufnahme der ersten (20) und ggf. zweiten (40) und/oder dritten Flüssigkeit vorgesehen ist.

30

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 22, wobei die zweite Leitung (34) in den zweiten Behälter (12) mündet und

ggf. vorhandene weitere Leitungen (30) in den dritten oder vierten Behälter münden.

5 24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 23, wobei im ersten (10), zweiten (12), dritten und/oder vierten Behälter jeweils ein darin verschiebbarer Kolben (22, 24) vorgesehen ist, mittels dem die erste (20), zweite (40) oder dritte Flüssigkeit bewegt werden kann.

10 25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 24, wobei der erste (10), zweite (12), dritte und/oder vierte Behälter jeweils in Form einer austauschbaren Patrone (48, 50) vorgesehen ist.

15 26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 25, wobei der erste (10), zweite (12), dritte und/oder vierte Behälter zylinderförmig ausgebildet ist.

20 27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 26, wobei der erste (10), zweite (12), dritte oder vierte Behälter ein maximales Volumen von 50 μ l bis 50 ml, bevorzugt von 500 μ l bis 5 ml, aufweist.

25 28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 27, wobei die Vorrichtung in ein Gerät zur, insbesondere automatisierten, Probenprozessierung einsetzbar ist.

30 29. Vorrichtung nach Anspruch 28, wobei das Gerät mindestens eine Einrichtung zur Verschiebung des Kolbens (22, 24) aufweist.

35 30. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 12 bis 29, wobei die Vorrichtung aus einem Kunststoff, insbesondere Polycarbonat, vorzugsweise mittels eines Spritzguss-Verfahrens, hergestellt ist.

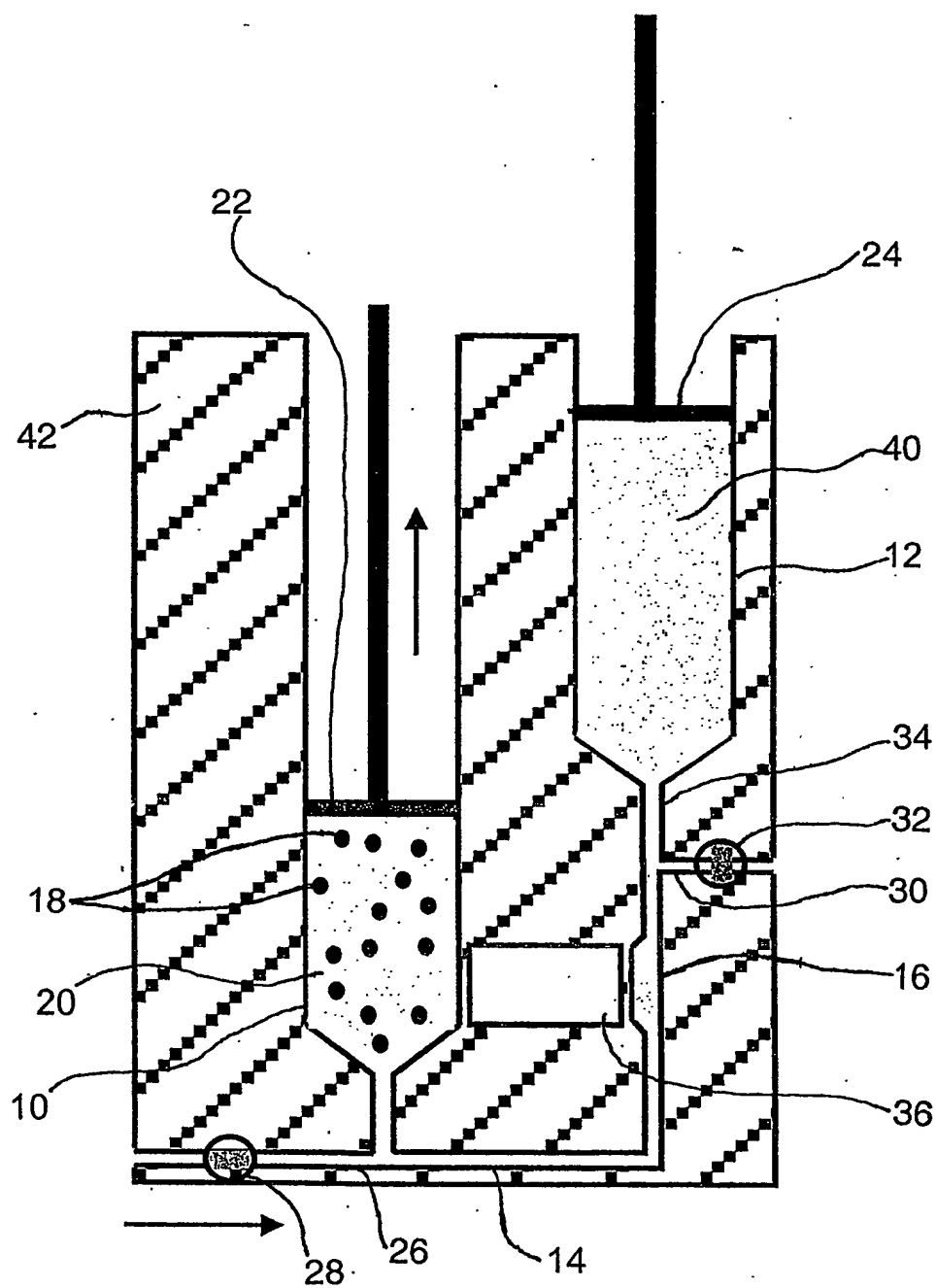


Fig. 1

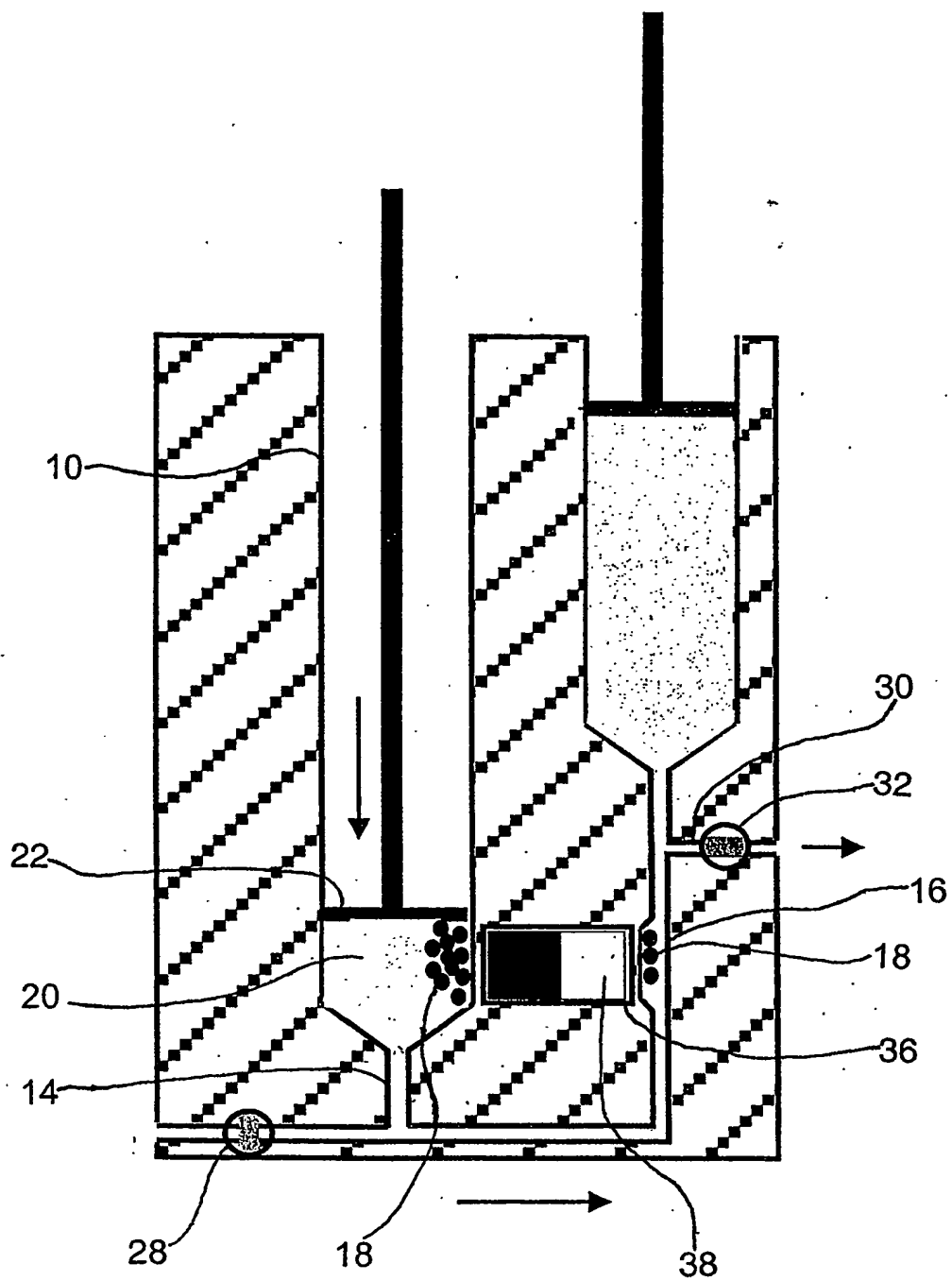


Fig. 2

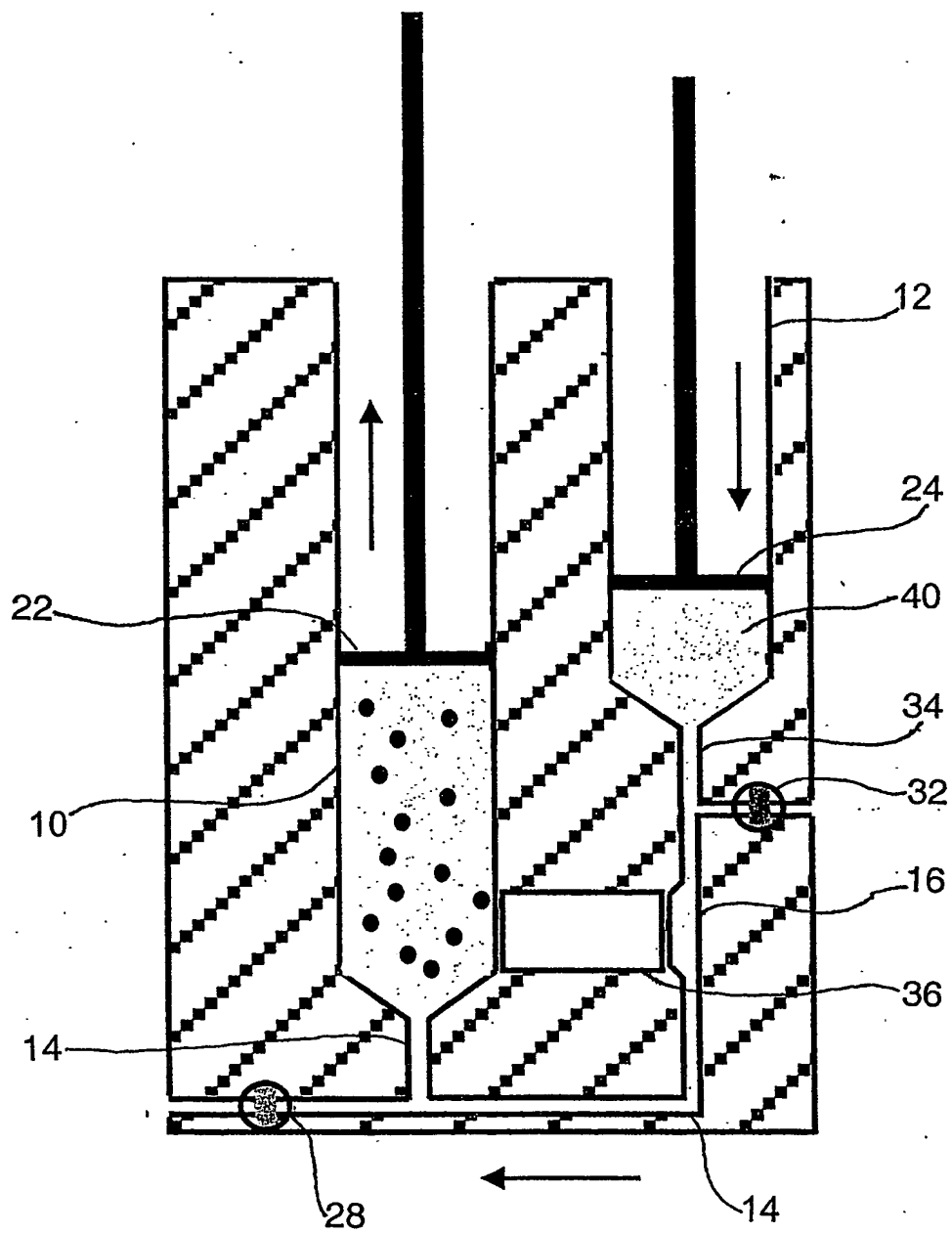


Fig. 3

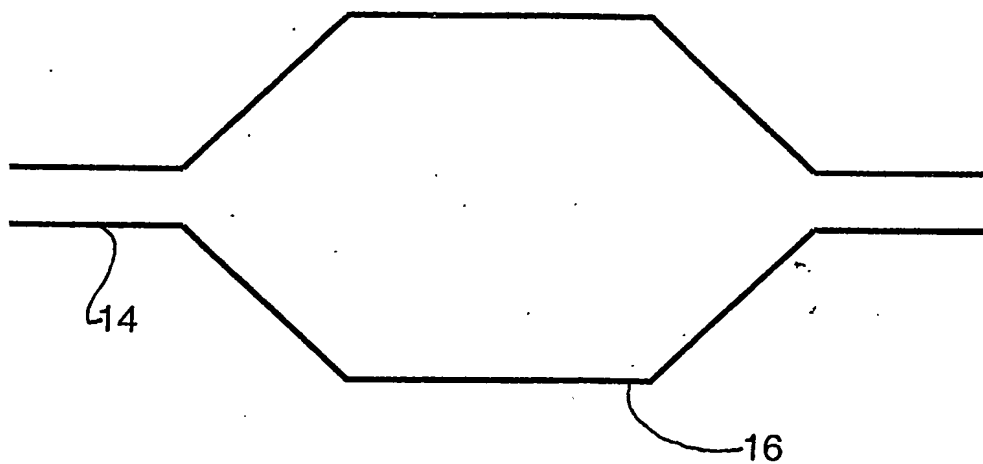


Fig. 4

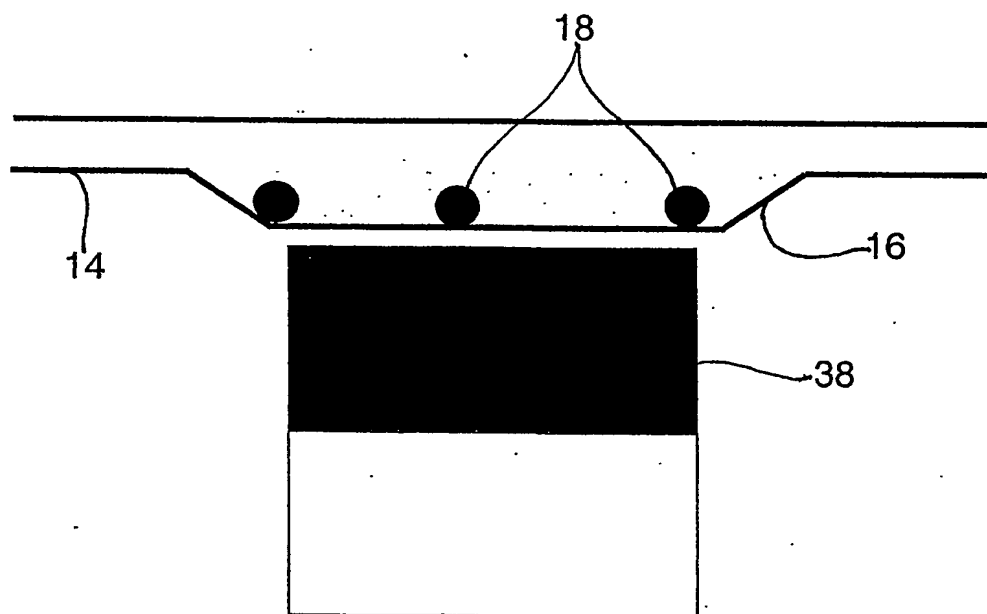


Fig. 5

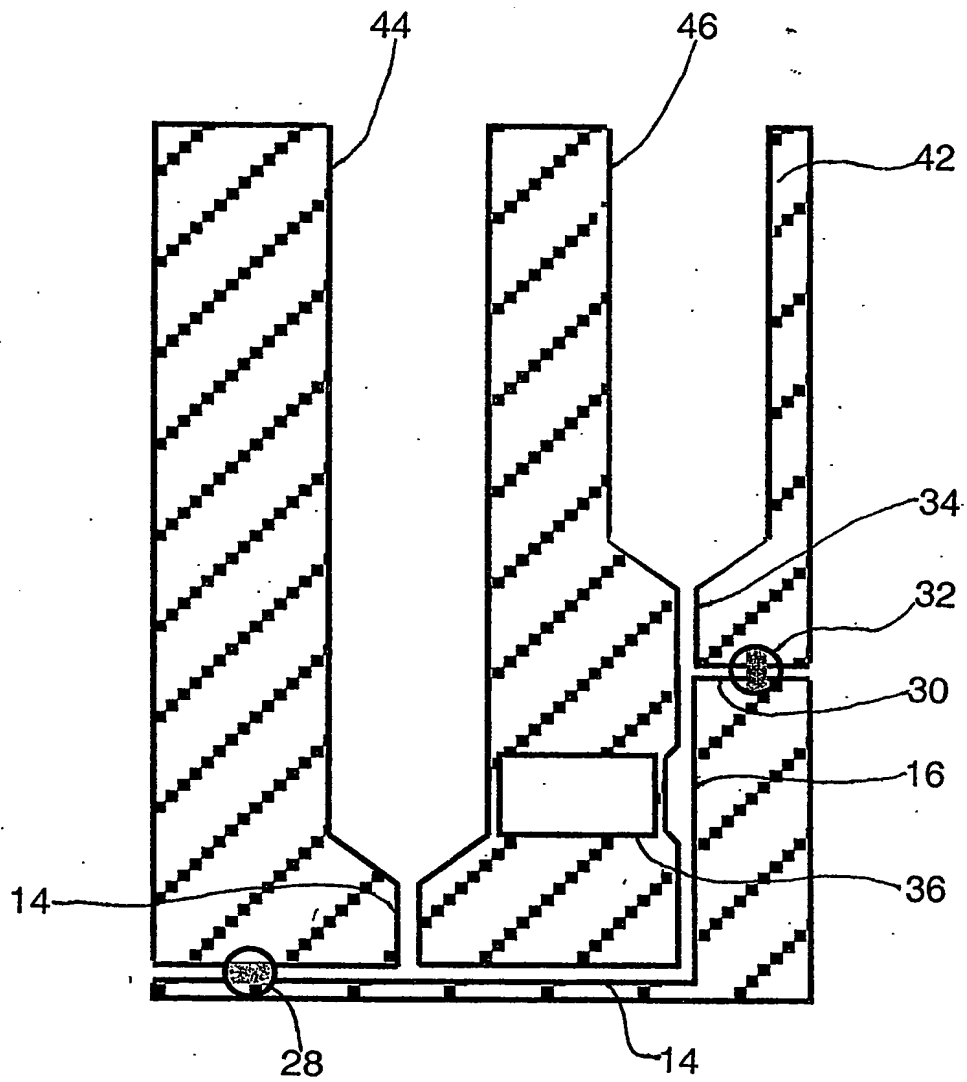


Fig. 6

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur verbesserten Reinigung einer ersten Substanz, welche an paramagnetische Mikropartikel 18 gebunden ist, wobei die Mikropartikel 18 in einer ersten Flüssigkeit 20 suspendiert sind, mit folgenden Schritten:

10 a) die Mikropartikel 18 werden in einem ersten Behälter 10 einem ersten Magnetfeld ausgesetzt, um sie dadurch festzuhalten und daran zu hindern, mit einem Strom der ersten Flüssigkeit 20 mitgeschwemmt zu werden und

15 b) zumindest ein Teil der ersten Flüssigkeit 20 wird nach Schritt lit. a in einer ersten Richtung durch eine erste Leitung 14 zu einem Abschnitt 16 der ersten Leitung 14 geleitet und dort mindestens einem zweiten oder erneut dem ersten Magnetfeld ausgesetzt, um dennoch mitgeschwemmte Mikropartikel 18 dadurch festzuhalten, wobei in dem Abschnitt 16 die Querschnittsfläche der ersten Leitung 14 vergrößert ist,

25 wobei das zweite oder erste Magnetfeld innerhalb des Abschnitts 16 eine größere durchschnittliche Feldstärke aufweist als das erste Magnetfeld innerhalb des ersten Behälters 10.

Fig. 2

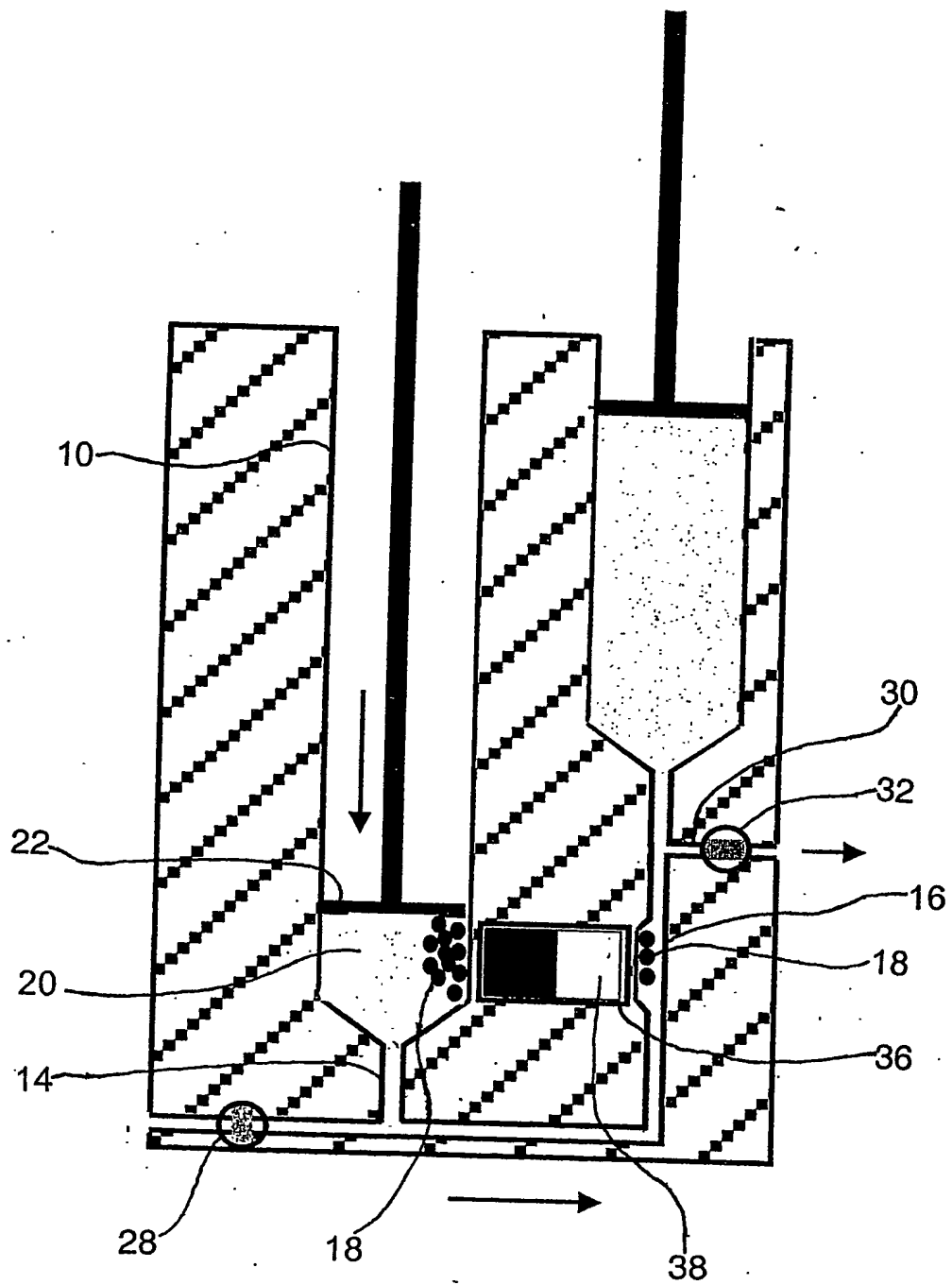


Fig. 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning these documents will not correct the image
problems checked, please do not report these problems to
the IFW Image Problem Mailbox.**